Ps 16

ISTITUTO DI MEDICINA LEGALE DELLA R. UNIVERSITÀ DI MODENA

Studî sugli elementi figurati del sangue in rapporto alla Medicina forense.

Ricerche sperimentali sull'emolisi da calore.

Prof. ATTILIO CEVIDALLI
Incaricato della Direzione e dell'Insegnamento

MODENA
G. FERRAGUTI E C., TIPOGRAFI
Via Servi, 5

1911.

Sincerely yours,

S. Cheidwell,

ISTITUTO DI MEDICINA LEGALE DELLA R. UNIVERSITÀ DI MODENA

Studî sugli elementi figurati del sangue in rapporto alla Medicina forense.

Ricerche sperimentali sull'emolisi da calore.

Prof. ATTILIO CEVIDALLI
Incaricato della Direzione e dell'Insegnamento

MODENA
G. FERRAGUTI E C., TIPOGRAFI
Via Servi, 5

1911.

Estratto dal *Bollettino della Società Medico-Chirurgica di Modena.*
Anno XIII. 1910-1911. (XXXVI della Società).

ISTITUTO DI MEDICINA LEGALE DELLA R. UNIVERSITÀ DI MODENA
Direttore incaricato: Prof. Dott. A. CEVIDALLI

Studî sugli elementi figurati del sangue in rapporto alla Medicina forense.

Ricerche sperimentali sull'emolisi da calore.

Prof. Dott. ATTILIO CEVIDALLI

L'importanza degli studî sul sangue nei rispetti della Medicina forense è universalmente riconosciuta.

E tale importanza è di un duplice ordine: si riferisce cioè, da un lato, allo studio del sangue per la diagnosi generica, specifica, individuale, regionale di esso, – argomento questo peculiare alla Medicina forense —, e, dall'altro, ai caratteri che esso assume in varî generi di morte.

In questa seconda parte lo studio del sangue è comune anche alla anatomia patologica, ma ha per le esigenze forensi un particolare interesse, in quanto in varî generi di morte violenta, come ad es. in alcune intossicazioni e in alcune morti asfittiche, si rivelano appunto cospicue, caratteristiche modificazioni di esso.

Gli studî sul sangue, sotto questi due punti di vista, che sebbene diretti a diverse finalità, hanno tra di loro intimi legami di tecnica e di metodo, sono oggidì assai progrediti. Molto tuttavia resta ancora a fare.

Ed invero, per ciò che si riferisce alla diagnosi specifica del sangue, è mia convinzione che debba esser nostro intento di trovare dei metodi puramente fisici, o chimici, o fisico-chimici, che ci permettano una diagnosi specifica senza dover ricorrere a quel delicatissimo ma misterioso reagente che è rappresentato dall'organismo vivo. Non vi è infatti nessuna ragione che debba *a priori* farci ritenere impossibile di differenziare colle nostre analisi ciò che l'or-

ganismo distingue tanto nettamente così da contrapporvi specifici anticorpi.

E a rafforzarci in tale concetto, valgono i mezzi già fin d'ora conosciuti, — se pure variamente apprezzati nella pratica —, che permettono in alcune contingenze una tale diagnosi specifica, senza ricorrere all'opera di altri organismi.

Alludo ai caratteri desumibili dalla diversa cristallizzazione dell'emoglobina, dalla diversa resistenza alle soluzioni alcaline ed acide, dalla diversa solubilità, dal diverso indice di rifrazione, dalla diversa composizione centesimale, dalla diversa attività scompositrice dell'acqua ossigenata, e via dicendo.

Parmi adunque che sotto questo rispetto un vasto campo ci si presenti dinanzi; ma altrettanto deve dirsi per ciò che si riferisce ai dati che può fornirci il sangue nelle questioni tanatologiche, nè credo che occorra spendere parole su ciò. Alle tante conquiste già assicurate su questi argomenti, ho pensato pertanto di aggiungere, nei limiti delle mie forze, qualche nuovo modesto contributo, dedicando ad essi la mia attività e quella di volonterosi giovani che desideravano presentare una tesi di laurea di carattere sperimentale. Come risultato delle indagini eseguite rendo ora di pubblica ragione alcuni saggi, in parte diretti appunto a mettere in luce specifiche proprietà dei varî sangui, e in parte a studiarne il comportamento postmortale, così importante presupposto di ogni questione tanatologica.

* * *

Le prime osservazioni sulla emolisi da calore risalgono al 1865 e si debbono allo Schultze [16]), il quale, nel lavoro in cui descriveva il tavolino riscaldabile che porta tuttora il suo nome, notava che i globuli rossi scaldati a 52° cambiano d'aspetto assumendo forma sferica, mentre la loro superficie diventa irregolare, producendosi in essa dei solchi che tendono ad isolare dei bottoni sferici, rilegati al centro per

mezzo di filamenti che poi si rompono, il globulo venendo così a segmentarsi in tanti frammenti che verso i 60° perdono la loro emoglobina.

Queste antiche ricerche dello Schultze sono rimaste, io credo, le più esatte; ben poco è stato aggiunto posteriormente.

Il Ranvier [14]) dice che sotto d'influenza del calore la sostanza dei globuli sembra fondersi (sic) e assumere la consistenza dell'olio; a 70° i globuli si decolorano e si trasformano in piccole sfere trasparenti, di volume assai ineguale.

Il Bürker [1]), nella sua completa monografia sull'emoglobina, nel paragrafo sulla cristallizzazione di questa, nota che nessuno dei vari metodi proposto è in grado di dare in ogni circostanza i cristalli, e, ricercando le ragioni di ciò, osserva tra l'altro che il liberare l'emoglobina dagli stromi non è egualmente facile nei varî animali.

Nè maggiori particolari per noi interessanti ho potuto trovare nei lavori di Calugareanu [3]) e di Stewart [17]), come pure nella monografia di Maragliano e Castellino [10]) sulla necrobiosi dei globuli rossi.

Mi parve pertanto che fosse opportuno di istituire ricerche comparative sull'andamento dell'emolisi da calore in varie speci animali, a ciò eccitato altresì dalla considerazione che, oltre che per le ragioni sopra esposte, l'argomento poteva condurre a risultati meritevoli di attenzione anche per l'oscuro problema della fisiopatologia delle ustioni, come stanno ad indicarlo tra gli altri gli studî di W. e M. de Bichler [4]), che accertarono che l'azione emolitica di un siero viene accresciuta col riscaldamento del corpo, e quelli del Burkhardt [2]), il quale fu condotto anch'egli a dare importanza nelle scottature ai fenomeni di emolisi.

Ho fatto oggetto delle mie ricerche il sangue dell'uomo, e degli animali seguenti: bue, agnello, capretto, cavallo, cavia, coniglio, maiale, cane, gatto, tacchino. Non potei procurarmi sangue di scimmia.

Per ogni esperienza defibrinavo il sangue e ne determinavo ogni volta la resistenza alle soluzioni ipotoniche,

servendomi di soluzioni di cloruro di sodio puro, delle quali la meno concentrata era al 0,10 %, mentre nelle altre il titolo era gradatamente maggiore, crescendo per ciascuna del 0,02 %. Introducendo in tante provette, contenenti 5 cm^3 delle soluzioni suddette, 2 gocce del sangue in esame, stabilivo adunque quale fosse la soluzione di massima concentrazione nella quale avvenisse emolisi macroscopicamente completa entro 15′, e quella di minima concentrazione nella quale invece non si verificasse emolisi affatto. Per quest'ultima determinazione (resistenza minima del Viola) la lettura non era naturalmente possibile che quando già i globuli avessero cominciato a sedimentare; l'eseguivo perciò dopo tre ore, ed intanto proseguivo nelle esperienze.

Sottoponevo cioè 5 cc. di sangue al riscaldamento, facendo uso di un semplice apparecchio nel quale il sangue rimaneva in un bagno maria alla temperatura costante di 60°. Di tempo in tempo, ad intervalli più o meno ravvicinati a seconda del caso, cimentavo l'andamento della resistenza, introducendo due gocce di sangue in provette contenenti soluzioni di cloruro sodico a partire da un titolo superiore a quello che aveva provocato l'emolisi totale. Anche qui la quantità di soluzione salina usata fu sempre di 5 cm^3.

In generale sottoponevo a contemporaneo riscaldamento due, tre o quattro speci di sangue, avendo così notevole risparmio di tempo e risultati sicurissimamente comparabili, anche dato che la temperatura avesse subito qualche oscillazione, cosa del resto che quasi mai si verificò.

Per semplificare alquanto il dispositivo dell'esperienza, mi limitai per lo più a saggiare la resistenza in soluzioni crescenti tra loro non già del 0,02 ma assai di più, per es. passavo dal 0,70 all'0,80, omettendo i gradi intermedi 0,72-0,74 ecc., perchè potei constatare che l'andamento del fenomeno veniva egualmente a delinearsi con esattezza senza dover tenere innanzi più centinaia di provette ed incorrere nel grave inconveniente di rendere sensibilmente diverso l'intervallo che intercorreva dal principio del riscaldamento al momento nel quale nelle singole provette il sangue veniva

introdotto. Anche qui, come per le determinazioni preliminari del sangue non riscaldato, le letture venivano fatte subito e dopo tre ore, cioè a sedimentazione talora avvenuta e talora solo iniziata, in quanto in queste ricerche ebbi occasione di verificare quanto già da altri è stato notato, e cioè che vi sono dei sangui che sedimentano rapidissimamente (per es. il sangue del cavallo), mentre altri impiegano un tempo più o meno lungo.

Come si vede dalle esperienze che riporto, non mi sono limitato per ogni specie ad un'unica prova, ma ho avuto cura di ripeterle con sangue di soggetti diversi, e ciò per poter tener conto di possibili variazioni individuali. Qualche volta ho eseguito anche per uno stesso campione di sangue due o tre prove, e ciò per maggior sicurezza di risultati, e specialmente per indagare le variazioni che potessero verificarsi nell'andamento del fenomeno per effetto del tempo trascorso dal prelevamento del sangue. E così pure talora cimentai al calore dei globuli lavati, per vedere l'influenza del siero, l'azione del quale non poteva *a priori* dichiararsi come aumentante o viceversa diminuente la resistenza al calore, poichè è risaputo che se in certi casi il siero esercita un'azione protettiva sui propri globuli, in altri invece li rende enormemente più sensibili agli agenti emolitici, come ad es. nel caso del tellurito di sodio, studiato dal Luzzatto [9]). Su questo punto tuttavia le mie esperienze non sono talmente numerose da permettermi conclusioni assolute.

Ed ecco senz'altro il risultato delle mie osservazioni, le quali espongo non in ordine cronologico, ma raggruppate per ogni specie, e ciò a scopo di maggiore chiarezza.

Uomo.

Uomo I.

Individuo di 65 anni con lievi fenomeni di ipertensione; salasso dal braccio.

Prima del riscaldamento: emolisi totale nella soluzione clorosodica al 0,32 %; nessuna traccia di emolisi nella soluzione al 0,40 %.

Riscaldamento a 60°: emolisi nel 0,64 dopo 10′; nel 0,70 dopo 10′; nel 0,80 dopo 15′; nell' 1 % dopo 20′.

Uomo I. — *Esperienza II.* — Porzione del sangue precedente lasciata a sè per 5 ore alla temperatura ambiente di 28°-30°.

Riscaldamento a 60°: emolisi nel 0,70 dopo 10′; nell' 1 % dopo 20′.

Uomo II.

Individuo di 70 anni degente all' Ospedale per fatti di trombosi cerebrale; salasso al braccio eseguito dal Primario Dott. A. Plessi.

Prima del riscaldamento: emolisi totale a 0,30; nulla nel 0,40.

Riscaldamento a 60°: emolisi nel 0,64 dopo 20′; nel 0,70 dopo 20′; nel 0,80 dopo 25′; nell' 1 % dopo 30′.

Uomo III.

Individuo di anni 41 in perfetta salute. Con puntura del polpastrello si fanno cadere due gocce di sangue per ciascuna di tre provette contenenti 5 cm³ di NaCl, rispettivamente al 0,64, al 0,74 e all' 1 %.

Riscaldamento a 60°: emolisi nel 0,64 dopo 10′; nel 0,74 dopo 10′; nell' 1 % dopo 18′.

Bue.

Bue I.

Prima del riscaldamento: emolisi totale nella soluzione clorosodica al 0,34 %; emolisi nulla nella soluzione al 0,48 %.

Riscaldamento a 60°: emolisi nel 0,64 dopo 35′; nel 0,70 dopo 40′; nel 0,80 dopo 55′; nell' 1,00 % dopo 65′.

Bue I. — *Esperienza II.* — 6 ore dopo la precedente. Temperatura ambiente 26°-28°.

Prima del riscaldamento: come la mattina.

Riscaldamento a 60°: emolisi nel 0,64 dopo 35′; nel 0,70 dopo 40′; nel 0,80 dopo 55′; nell' 1 % dopo 60′.

Bue II.

Prima del riscaldamento: emolisi totale al 0,34; nulla al 0,50.

Riscaldamento a 60°: emolisi nel 0,60 dopo 15′; nel 0,70 dopo 30′; nel 0,80 dopo 55′; nell' 1,00 dopo 70′.

Bue III.

Emolisi totale nel 0,34; nulla nel 0,50.

Riscaldamento a 60°: emolisi nel 0,54 dopo 10′; nel 0,58 dopo 15′; nel 0,64 dopo 30′; nel 0,70 dopo 40′; nel 0,80 dopo 55′; nell' 1 % dopo 65′.

Bue III. — *Esperienza II.* — Globuli lavati. Una porzione di sangue del bue precedente, conservata a temperatura ambiente (10°-15°) per 48 ore, viene ripetutamente lavata con soluzione di NaCl al 0,90 e successive centrifugazioni, sino a non aversi più nella soluzione di lavaggio alcuna reazione delle sostanze proteiche.

Riscaldamento a 60°: Emolisi nel 0,58 dopo 20′; nel 0,64 dopo 50′; nel 0,70 dopo 55′; nel 0,80 % dopo 70′; nell' 1,00 dopo 105′.

Bue IV.

Emolisi totale nel 0,36; nulla nel 0,50.

Riscaldamento a 60°: Emolisi nel 0,64 dopo 30′; nel 0,70 dopo 50′; nell' 1 % dopo 65′.

Bue IV. — *Esperienza II.* — 3 ore dopo la precedente. Temperatura ambiente 28°-30°.

Riscaldamento a 60°: Emolisi nel 0,64 dopo 30′; nell' 1 % dopo 65′.

Bue IV. — *Esperienza III.* — 24 ore dopo la precedente. Temperatura ambiente 28°-30°. Prima del riscaldamento emolisi completa nel 0,62.

Riscaldamento a 60°: Emolisi nell' 1,00 % dopo 80′.

Agnello.

Agnello I.

Prima del riscaldamento: Emolisi completa nel 0,46; nulla nel 0,68.

Riscaldamento e 60°: Emolisi nel 0,70 dopo 30′; nel 0,80 dopo 50′; nell' 1,00 dopo 100′.

Agnello II.

Prima del riscaldamento: Emolisi completa al 0,50; nulla nel 0,70.

Riscaldamento a 60°: Emolisi nel 0,80 dopo 60′; nel 0,90 dopo 70′; nell' 1 % dopo 90′.

Agnello III.

Prima del riscaldamento: Emolisi completa al 0,48; nulla nel 0,62.

Riscaldamento a 60°: Emolisi nel 0,64 dopo 30′; nel 0,70 dopo 50′; nel 0,80 dopo 55′; nell'1 % dopo 90′.

Agnello III. — *Esperienza II.* — 24 ore dopo la precedente. Temperatura ambiente 28°-30°. Prima del riscaldamento: emolisi completa nel 0,64; nulla nel 0,80.

Riscaldamento a 60°: Emolisi nell' 1,00 dopo 90′.

Capretto.

Capretto I.

Prima del riscaldamento: Emolisi completa nel 0,48; niente nel 0,62.

Riscaldamento a 60°: Emolisi nel 0,64 dopo 15′; nel 0,70 dopo 30′; nell'0,80 dopo 70′: nell' 1 % dopo 90′.

Capretto I. — *Esperienza II.* — 4 ore dopo la precedente. Temperatura ambiente 28°-30°.

Riscaldamento a 60°: Emolisi nel 0,80 dopo 70′; nell' 1,00 dopo 80′.

Cavallo.

Cavallo I.

Prima del riscaldamento: Emolisi completa nel 0,36; nulla nel 0,50.

Riscaldamento a 60°: Emolisi nel 0,64 dopo 9′; nel 0,70 dopo 15′; nel 0,80 dopo 15′; nell'1 % dopo 22′.

Cavallo I. — *Esperienza II.* — 4 ore dopo la precedente. Temperatura ambiente 28°-30°.

Riscaldamento a 60°: Emolisi nel 0,70 dopo 15′; nell' 1,00 % dopo 22′.

Cavallo II.

Prima del riscaldamento: Emolisi completa nel 0,40; nulla nel 0,52.

Riscaldamento a 60°: Emolisi nel 0,54 dopo 5′; nel 0,58 dopo 5′; nel 0,70 dopo 15′; nel 0,80 dopo 15′; nell' 1,00 dopo 29′.

Cavallo II. — *Esperienza II.* — Globuli lavati. Una porzione del sangue del cavallo precedente, conservata a temperatura

ambiente (10°-15°) per 48 ore, viene ripetutamente lavata con soluzione di NaCl al 0,90 %, sino a non aversi più nella soluzione di lavaggio la reazione delle albumine.

Riscaldamento a 60°: Emolisi nell'1 % dopo 35′.

Cavallo III.

Prima del riscaldamento: Emolisi totale nel 0,50; nulla nel 0,64.

Riscaldamento a 60°: Emolisi nell'1 % dopo 30′.

Cavallo IV.

Prima del riscaldamento: Emolisi totale nel 0,50; nulla nel 0,64.

Riscaldamento a 60°: Emolisi nel 0,64 dopo 15′; nell'1 % dopo 40′.

Cavallo IV. — *Esperienza II.* — 8 ore dopo la precedente. Temperatura ambiente 28°-30°.

Riscaldamento a 60°: Emolisi nel 0,64 dopo 15′; nell'1 % dopo 30′.

Cavia.

Cavia I.

Prima del riscaldamento: Emolisi totale nel 0,32; nulla nel 0,54.

Riscaldamento a 60°: Emolisi nel 0,64 dopo 6′; nel 0,70 dopo 9′; nel 0,80 dopo 9′; nell'1 % dopo 16′.

Cavia I. — *Esperienza II.* — 4 ore dopo la precedente. Temperatura ambiente 28°-30°.

Riscaldamento a 60°: Emolisi nel 0,80 dopo 9′; nell'1 % dopo 15′.

Cavia II.

Prima del riscaldamento: Emolisi totale nel 0,34; nulla nel 0,54.

Riscaldamento a 60°: Emolisi nel 0,70 dopo 9′; nell'1 % dopo 9′.

Cavia II. — *Esperienza II.* — 3 ore dopo la precedente.

Riscaldamento a 60°: Emolisi nel 0,60 dopo 3′; nel 0,70 dopo 5′; nel 0,80 dopo 9′; nell'1 % dopo 10′.

Cavia III.

Prima del riscaldamento: Emolisi totale nel 0,34, nulla nel 0,50.

Riscaldamento a 60°: Emolisi nel 0,64 dopo 9′; nell' 1 % dopo 10′.

Cavia IV.

Dall' orecchio si fanno cadere due gocce di sangue per ciascuna di 3 provette con 5 cm³ di NaCl al 0,64, al 0,74 e all' 1 %.

Riscaldamento a 60°: Emolisi nel 0,64 dopo 7′; nel 0,74 dopo 8′; nell' 1 % dopo 8′.

Coniglio.

Coniglio I.

Prima del riscaldamento: Emolisi totale a 0,36; nulla nel 0,52.

Riscaldamento a 60°: Emolisi nel 0,78 dopo 10′; nel 0,80 dopo 15′; nell'1,00 dopo 15′.

Coniglio II.

Prima del riscaldamento: Emolisi totale a 0,38; nulla nel 0,52.

Riscaldamento a 60°: Emolisi nel 0,64 dopo 6′; nel 0,80 dopo 15′; nell'1,00 dopo 20′.

Coniglio II. — *Esperienza II.* — 4 ore dopo la precedente. Temperatura ambiente 28°-30°.

Riscaldamento a 60°: Emolisi nel 0,80 dopo 9′; nell' 1 % dopo 15′.

Coniglio III.

Dall' orecchio si fanno cadere due gocce di sangue in tre provette con 5 cm³ di NaCl rispettivamente al 0,64, al 0,74 e all' 1 %.

Riscaldamento a 60°: Emolisi nel 0,64 dopo 9′; nell' 0,74 dopo 10′; nell' 1 % dopo 12′.

Coniglio IV.

Prima del riscaldamento: Emolisi nel 0,38; nulla nel 0,54.

Riscaldamento a 60°: Emolisi nel 0,64 dopo 15′; nel 0,70 dopo 20′; nel 0,80 dopo 20′; nell' 1 % dopo 20′.

Coniglio V.

Prima del riscaldamento: Emolisi totale nel 0,40; nulla nel 0,50.

Riscaldamento a 60°: Emolisi nel 0,64 dopo 8′; nel 0,70 dopo 15′; nel 0,80 dopo 20′; nell' 1 % dopo 20′.

Coniglio V. — *Esperienza II.* — Due gocce di una porzione del sangue precedente, lasciata a sè per quattro ore alla temperatura ambiente di 28°-30°, si sospendono in 5 cm³ NaCl 1 %.

Riscaldamento a 60°: Emolisi completa dopo 10′.

Maiale.

Maiale I.

Prima del riscaldamento: Emolisi totale nel 0,40; nulla nel 0,68.

Riscaldamento a 60°: Emolisi nel 0,70 dopo 20′; nel 0,80 dopo 35′; nell' 1 % dopo 57′.

Maiale I. — *Esperienza II.* — Due gocce di una porzione del sangue precedente, lasciata a sè per 4 ore alla temperatura ambiente di 28°-30°, si sospendono in 5 cm³ NaCl 1 %.

Riscaldamento a 60°: Emolisi dopo 47′.

Maiale II.

Prima del riscaldamento: Emolisi completa nel 0,46; nulla nel 0,68.

Riscaldamento a 60°: Emolisi nel 0,70 dopo 20′; nel 0,80 dopo 35′; nell' 1 % dopo 57′.

Maiale III.

Prima del riscaldamento: Emolisi completa nel 0,50; nulla nel 0,72.

Riscaldamento a 60°: Emolisi nel 0,80 dopo 44′; nell' 1 % dopo 85′.

Maiale III. — *Esperienza II.* — Una porzione del sangue, lasciata a sè per 24 ore alla temperatura ambiente di 28°-30°, presenta accenno di emolisi anche nel sale all' 1 %.

Riscaldamento a 60°: emolisi completa nell' 1 % dopo 23′.

Cane.

Cane I.

Prima del riscaldamento: Emolisi completa nel 0,36; nulla nel 0,50.

Riscaldamento a 60°: Emolisi nel 0,64 dopo 10′; nel 0,70 dopo 10′; nel 0,80 dopo 10′; nell' 1 % dopo 15′.

Cane II.

Prima del riscaldamento: Emolisi completa nel 0,40; nulla nel 0,52.

Riscaldamento a 60°: Emolisi nel 0,64 dopo 12′; nel 0,70 dopo 12′; nel 0,80 dopo 15′; nell' 1 % dopo 17′.

Cane III.

Prima del riscaldamento: Emolisi completa nel 0,38; nulla nel 0,52.

Riscaldamento a 60°: Emolisi nel 0,64 dopo 6′; nel 0,70 dopo 6′; nel 0,80 dopo 6′; nell' 1,00 % dopo 16′.

Cane III. — Per studiare eventuali differenze tra sangue arterioso e sangue venoso, si estraggono 30 cm³ di sangue della giugulare e 30 dalla carotide.

Riscaldamento a 60°: Emolisi nel 0,80 pel sangue arterioso dopo 10′, pel venoso dopo 9′; nell' 1 % pel sangue arterioso dopo 10′, pel venoso dopo 9′.

Gatto.

Gatto I.

Prima del riscaldamento: Emolisi completa nel 0,38; nulla nel 0,52.

Riscaldamento a 60°: Emolisi nel 0,64 dopo 5′; nel 0,70 dopo 5′; nell'0,80 dopo 5′; nell'1,00 % dopo 8′.

Gatto I. — *Esperienza II.* — 2 ore dopo la precedente. Temperatura ambiente 28°-30°.

Riscaldamento a 60°: Emolisi nel 0,8 dopo 7′; nell' 1 % dopo 10′.

Tacchino.

Tacchino I.

Prima del riscaldamento: Emolisi completa nel 0,28; nulla nel 0,50.

Riscaldamento a 60°: Emolisi nel 0,64 dopo 50′; nel 0,70 dopo 50′; nel 0,80 dopo 50′; nell' 1 % dopo 50′.

Tacchino. I. — *Esperienza II.* — Porzione del sangue precedente lasciata a sè per 16 ore, alla temperatura ambiente di 28°-30°.

Riscaldamento a 60°: Emolisi nel 0,64 dopo 35′; nel 0,70 dopo 40′; nel 0,80 dopo 40′; nell' 1,00 dopo 40′.

TACCHINO II.
Prima del riscaldamento: Emolisi totale a 0,24; nulla nel 0,52.
Riscaldamento a 60°: Emolisi nell'1 % dopo 55′.

Da queste ricerche risulta in modo evidente che vi sono tra specie e specie notevoli differenze nella resistenza opposta al calore. Ed invero, mentre nel gatto basta un riscaldamento a 60° di soli 8′ per dare una completa emolisi nel sale all'1,00 %, per l'agnello invece occorrono, onde ottenere lo stesso effetto minuti 93, vale a dire un periodo di tempo circa 12 volte maggiore.

Esaminando poi l'andamento delle alterazioni prodotte dal calore rispetto alle singole soluzioni cloro-sodiche, e scegliendo tra queste le soluzioni al 0,64, al 0,70, al 0,80 e infine quella all'1 %, otteniamo per ciascuna specie, rispetto al sangue defibrinato fresco *in toto*, le medie seguenti:

TABELLA I. — **Emolisi completa in NaCl al 0,64 %:**

Dopo minuti di riscaldamento a 60°	
5′	— **Gatto**
7′ e 30″	— **Cavia**
9′	— **Cane**
9′	— **Coniglio**
12′	— **Cavallo**
15′	— **Uomo**
15′	— **Capretto**
30′	— **Agnello**
31′	— **Bue**
50′	— **Tacchino**

N. B. Il maiale presentò traccie di emolisi nel 0,64 già prima del riscaldamento.

TABELLA II. — **Emolisi completa in NaCl al 0,70 %:**

Dopo minuti di riscaldamento a 60°	
5′	— **Gatto**
9′	— **Cavia**
9′	— **Cane**
15′	— **Uomo**
15′	— **Cavallo**
17′	— **Coniglio**
20′	— **Maiale**
30′	— **Capretto**
36′	— **Bue**
40′	— **Agnello**
50′	— **Tacchino**

TABELLA III. — **Emolisi completa in NaCl al 0,80 %:**

Dopo minuti di riscaldamento a 60°	
5′	— **Gatto**
9′	— **Cavia**
10′	— **Cane**
15′	— **Cavallo**
17′	— **Coniglio**
20′	— **Uomo**
38′	— **Maiale**
50′	— **Tacchino**
55′	— **Bue**
55′	— **Agnello**
70′	— **Capretto**

TABELLA IV. — **Emolisi completa in NaCl all'1,00 %:**

Dopo minuti di riscaldamento a 60°	
8′	— **Gatto**
11′	— **Cavia**
13′	— **Cane**
18′	— **Coniglio**
25′	— **Uomo**
30′	— **Cavallo**
52′	— **Tacchino**
66′	— **Bue**
66′	— **Maiale**
90′	— **Capretto**
93′	— **Agnello.**

Esaminando queste quattro tabelle si può constatare che l'azione del calore si esercita per ciascuna specie in modo abbastanza uniforme rispetto al comportamento nelle varie soluzioni cloro-sodiche, in quanto l'ordine secondo il quale vengono a disporsi i vari animali è ad un dipresso eguale per tutte.

E così il gatto occupa sempre il primo posto; la cavia sempre il secondo; il cane il secondo o il terzo; il coniglio il terzo, il quarto o il quinto; il cavallo il terzo, quarto o sesto; l'uomo il terzo, il quinto o il sesto; il capretto il quinto, il sesto, il nono o il decimo; l'agnello il sesto, l'ottavo il nono o il decimo; il bue il settimo, l'ottavo o il nono; il tacchino il settimo, l'ottavo o il nono; il maiale il quinto, il settimo o l'ottavo.

Volendo ripartire in categorie le varie speci secondo la resistenza opposta al calore, vediamo che considerando il comportamento nella soluzione salina al 0,64 non si potrebbero stabilire che tre categorie, e cioè una di minima resistenza comprendente il gatto, una di media comprendente la cavia, il coniglio, il cane, il cavallo, il capretto e

l'uomo, una di forte resistenza costituita dall'agnello, dal bue, dal tacchino.

Ma la soluzione al 0,64 non è certo quella che più si presta ad una divisione in categorie, e ciò perchè alcune speci già prima del riscaldamento presentano nel sale a questo titolo un'emolisi più o meno accentuata, come è il caso per il maiale, specie che appunto per tale ragione non figura nella Tabella I.

E così pure vediamo che nel capretto si può avere emolisi ancora nel 0,60; il che ben ci spiega come nella serie del 0,64 questa specie venga prima di altre, che poi appaiono meno resistenti, in quanto il piccolo divario tra la soluzione emolizzante e quella al 0,64, di per sè non emolizzante, deve naturalmente essere ben presto colmato per effetto del calore. Esaminando i miei protocolli, risulta infatti il dato importante che il calore non provoca un'emolisi improvvisa, ma produce gradatamente alterazioni tali nel globulo che questo, quando non abbandona ancora l'emoglobina in seno al siero o in soluzioni isotoniche, già è diventato invece incapace di trattenerla in soluzioni cloro-sodiche di titolo inferiore, ma prima del riscaldamento non emolizzanti.

Altrettanto può dirsi per la soluzione al 0,70 %, dato che per talune specie, come il maiale, essa o è appena superiore a quella di titolo strettamente sufficiente a non provocare emolisi (V. i dati del maiale, N. II), o addirittura ad essa inferiore (V. i dati riferentisi al maiale N. III).

Le soluzioni al 0,80 e all'1,00 %, per sè stesse non mai emolitiche, ma anzi sensibilmente superiori alla soluzione di massima concentrazione ancora emolizzante, ci permettono un'analisi più minuta e una divisione in quattro o cinque categorie, e cioè:

Per la soluzione cloro-sodica al 0,80 %:

I.ª	Categoria;	*minima*	resistenza:	gatto.
II.ª	»	*piccola*	»	cavia, cane, cavallo, coniglio, uomo.
III.ª	»	*media*	»	maiale, tacchino.
IV.ª	»	*forte*	»	bue, agnello, capretto.

E per la soluzione cloro-sodica all'1 %:

I.ª	Categoria;	*minima*	resistenza:	gatto.
II.ª	»	*piccola*	»	cavia, cane, coniglio.
III.ª	»	*media*	»	uomo, cavallo.
IV.ª	»	*forte*	»	tacchino, bue, maiale.
V.ª	»	*fortissima*	»	capretto, agnello.

Ma in ogni ricerca biologica, se le medie dànno un'idea sintetica dei fatti, le variazioni individuali rendono necessario di tener calcolo dei valori estremi. Vediamo pertanto, se tenendo questi in considerazione, rimangano o no immutate le dette categorie.

Nello specchietto seguente raccolgo i valori limiti ottenuti in ciascuna specie rispetto alla soluzione al 0,80 % e all'1 %:

Valori limiti rispetto alle soluzioni al 0,80 %:

	Minimo in minuti	Massimo in minuti
Uomo	15′	25′
Bue	55′	55′
Agnello	50′	60′
Capretto	70′	70′
Cavallo	15′	15′
Cavia	9′	9′
Coniglio	15′	20′
Maiale	35′	44′
Cane	6′	15′
Gatto	5′	5′
Tacchino	50′	50′

Valori limiti rispetto alle soluzioni all'1 %:

	Minimo in minti	Massimo in minuti
Uomo	20′	30′
Bue	65′	70′
Agnello	90′	100′
Capretto	90′	90′
Cavallo	22′	40′
Cavia	9′	16′
Coniglio	15′	20′
Maiale	57′	85′
Cane	9′	17′
Gatto	8′	8′
Tacchino	50′	55′

Da queste due tabelle appare, che anche tenendo conto dei valori estremi, si possono mantenere varie categorie, ancora con limiti abbastanza distinti, e cioè:

Per la soluzione al 0,80 %:

I.ª Categoria, da 5′ a 10′: Gatto, cavia, cane.
II.ª » da 10′ a 15′: Cane, cavallo, coniglio, uomo.
III.ª » da 15′ a 25′: Coniglio, uomo.
IV.ª » più di 35′: Maiale, tacchino, bue, agnello, capretto.

Per la soluzione all'1,00 %:

I.ª Categoria, da 8′ a 20′: Gatto, cavia, cane, coniglio, uomo.
II.ª » da 21′ a 30′: Cavallo, uomo.
III.ª » da 31′ a 40′: Cavallo.
IV.ª » da 50′ a 85′: Bue, maiale, tacchino.
V.ª » da 90′ a 100′: Agnello, capretto.

Come ho detto nell'esporre la tecnica, in qualche caso ho ricercato l'andamento dell'emolisi da calore anche nei

globuli lavati, e così pure ho indagato come si comportasse il sangue dopo un tempo più o meno lungo dalla sua estrazione dall'organismo.

Dalle poche ricerche eseguite sotto questi due punti di vista, sopra riportate per ogni singola specie, pare risulti che il siero non eserciti influenza perturbatrice notevole, in quanto cioè l'ordine di resistenza delle varie specie al calore non verrebbe a subire spostamenti.

E così pure non pare esercitare una grande influenza un breve periodo lasciato trascorrere dopo l'estrazione del sangue. Va da sè che un periodo lungo, nello stesso modo che conduce ad emolisi spontanea, facilita anche l'emolisi da calore, come dimostrano i dati riguardanti il maiale N. III. Periodi di tempo brevi hanno al contrario un'azione come ho detto assai lieve e di natura non costante; sembra tuttavia prevalere un qualche aumento della resistenza, secondo quanto accennerrebbero i dati riferentisi al bue N. IV.

Su eventuali discrepanze tra sangue arterioso e venoso non ho che una sola esperienza, quella del cane N. III; essa non dimostrò tra le due qualità di sangue che una differenza assai scarsa, nel senso di una alquanto minor resistenza nel sangue venoso. Ma non è da escludersi che risultati diversi siano per ottenersi impedendo che il sangue venoso venga in contatto con l'ossigeno dell'aria.

* * *

Per azione del calore si modifica anche la viscosità del sangue.

In generale si osserva che la viscosità va dapprima aumentando, probabilmente per iniziali alterazioni dei globuli e in modo del tutto analogo a quanto il Ferrai [6]) stabilì pel cane nei primi stadi della putrefazione; poi, allo stabilirsi dell'emolisi, scema rapidamente. Si ha così una curva che corrisponde a quelle date dal Ferrai, con la sola differenza che nelle mie ricerche la curva s'inizia e si completa in un tempo assai più breve. Con i risultati del Ferrai

e miei concordano pure i dati del Moruzzi [12]) e quelli ottenuti dalla Gardella [7]), la quale durante l'emolisi da ammoniaca constatò un rapido aumento iniziale della viscosità, cui succede una pur rapida diminuzione.

In seguito il comportamento presenta differenze secondo le speci.

Così nella cavia ben presto la viscosità riaumenta e raggiunge valori enormi; un semplice esame microscopico mi dimostrò esser ciò dovuto alla formazione di cristalli di emoglobina di forma tetraedrica caratteristica e di dimensioni varianti, sino ad essere talora visibili ad occhio nudo.

Anche il cavallo, dopo la rapida caduta della viscosità, presenta un successivo notevole rialzo. Nelle altre speci il rialzo secondario nel valore della viscosità è tardivo, ovvero non ebbi agio di constatarlo. È superfluo l'avvertire che se il calore agisce troppo a lungo si può incorrere nel pericolo di provocare la coagulazione delle proteine.

Nel corso di queste ricerche, ho potuto fare alcune osservazioni sulla trasformazione della emoglobina in metemoglobina, che credo utile di riportare.

È noto che l'ossiemoglobina passa con grande facilità, sebbene in quantità varia, allo stato di metemoglobina.

Piettre e Vila [13]) nel 1905 e nel 1906 pubblicarono delle ricerche in base alle quali credettero di poter affermare che l'ossiemoglobina ha uno spettro d'assorbimento rappresentato non soltanto dalle due bande classiche α e β, ma anche da una terza banda, col punto di massima evidenza corrispondente a $\lambda = 634$. Orbene, non fu difficile dimostrare [Ville e Derrien [18])] che questa pretesa terza banda dell'ossiemoglobina non era ad altro dovuta che a tracce di metemoglobina spontaneamente formatasi.

E così pure la famosa distinzione dell'emoglobina di un medesimo individuo in quattro varietà α, β, γ, δ, sulle quali tanto hanno insistito il Bohr e alcuni suoi seguaci, fu dimostrata dallo Hüfner [8]) insostenibile e dovuta appunto all'essere incorso il Bohr, nei suoi studi spettrofotometrici,

nell'errore di esaminare campioni di emoglobina mista a quantità varie di metemoglobina.

Orbene, io nelle mie ricerche ho potuto confermare che il sangue riscaldato a 60°, in modo da produrre la lisi dei globuli rossi in seno al siero o col trasporto nelle soluzioni saline suddette, tende a metemoglobinizzarsi, e la metemoglobina può raggiungere una quantità tale da essere facilmente apprezzabile non solo allo spettroscopio, ma anche all'occhio nudo, per il cambiamento del colorito, appunto quando si verifica l'emolisi.

Ma ho potuto anche osservare che il tempo impiegato alla metemoglobinizzazione varia assai da specie a specie, e che se in genere è appunto in rapporto col tempo impiegato per l'emolisi, tale rapporto non è tuttavia assoluto. E precisamente il cavallo e il coniglio presentano una grande facilità alla metemoglobinizzazione, maggiore di quella della cavia, specie che invece resiste meno all'azione emolizzante del calore.

*
* *

Accennato così brevemente a queste osservazioni che ebbi agio di fare sebbene ad esse non abbia rivolto che in via secondaria la mia attenzione, è d'uopo riprendere in esame i dati che ho potuto mettere in luce rispetto appunto al fenomeno per lo studio del quale intrapresi le ricerche.

Si presenta infatti opportuno un esame comparativo tra la resistenza opposta dalle emazie al calore e quella opposta a qualche altro agente emolitico.

E, in primo luogo, prendendo in considerazione l'emolisi da ipotonia, possiamo constatare che non v'è affatto un assoluto parallelismo tra questa e l'emolisi da calore.

Infatti, vediamo che alle soluzioni ipotoniche la minima resistenza è opposta dal maiale, dall'agnello e dal capretto, che subiscono emolisi completa ancora in soluzioni al 0,45 (maiale) e al 0,48 (agnello, capretto), dovendosi

salire sino alla concentrazione del 0,69 (maiale) o del 0,62 (capretto) e 0,66 (agnello), per evitare qualunque accenno di emolisi.

Orbene, il maiale, il capretto e l'agnello presentano invece all'azione emolitica del calore una forte resistenza, fortissima anzi per l'agnello e il capretto, nelle quali due speci raggiunge appunto il suo massimo.

Viceversa, la cavia che resiste così poco al calore, oppone alle soluzioni ipotoniche una resistenza notevolissima.

In secondo luogo, confrontando la resistenza all'emolisi da calore con quella alla putrefazione, e utilizzando per quest'ultima i dati delle ricerche eseguite in questo laboratorio da A. Mazzotto [11]), vediamo esservi anche qui una singolare sconcordanza tra la minima resistenza opposta all'emolisi putrefattiva dall'agnello e dal maiale, e la forte al calore opposta — come abbiamo visto — da queste due speci.

Un terzo ordine di comparazione ci è fornito dalla emolisi da acidi (acido acetico), recentemente fatta oggetto di studio dalla Robert [15]) nel laboratorio di Henri. Sfortunatamente, poche sono state le speci prese in considerazione dalla Robert, mossa alle sue ricerche da scopi diversi dai miei. Comunque, da esse risulta che minima resistenza all'azione emolizzante degli acidi fu opposta dall'uomo, media dal coniglio e dal cavallo, forte dal bue, fortissima poi dal cane, che all'acido risultò quasi per nulla sensibile.

Anche qui manca il parallelismo coll'emolisi da calore: infatti, mentre rispetto a questa abbiamo visto essere il sangue di cane fra i più sensibili al calore, (valori limiti pel 0,80: 6′ — 15′, valore della media 10′; valori limiti per l'1 %: 9′ — 17′, valore della media 13′), ecco che nell'emolisi da acidi appare resistentissimo, assai più di quello del coniglio, del cavallo, dell'uomo, e persino del bue, il

quale al calore è al contrario enormemente più resistente di esso.

Passando dalla resistenza agli acidi a quella opposta all'emolisi da alcali, possiamo utilizzare le osservazioni di E. Gardella [7]) eseguite nel Laboratorio del Sabbatani, sebbene anche queste relative solo a un numero di speci non troppo numeroso. Ad ogni modo da esse risulta che il cane ha una resistenza maggiore di quella del cavallo, contrariamente a quanto si verifica pel calore, pel quale il cavallo ha appunto resistenza maggiore che il cane.

Utilizzando le ricerche di Dungern e Coca [5]) sull'azione emolitica di soluzioni saline isotoniche, ci è concesso un altro mezzo di comparazione. Dungern e Coca, studiando l'azione sul sangue di soluzioni isotoniche di varii sali corrispondenti a soluzioni di NaCl all'0,80 %, trovarono, trascurando le variazioni individuali, che il solfato di manganese è fortemente emolitico per il bue, per nulla affatto per il cane, i globuli rossi del quale si sciolgono invece rapidamente nelle soluzioni isotoniche di saccarosio, che alla loro volta sono indifferenti pel gatto.

Il cloruro potassico, discretamente emolitico per il bue e il gatto, è del tutto indifferente per la cavia e il coniglio. Per l'uomo l'azione massimamente emolitica era esercitata dal cloruro di calcio. Il maiale si mostrò assai resistente in tutte le soluzioni.

Da queste ricerche emergono varii interessanti risultati, e tra essi è notevole il modo di comportarsi tanto differente del gatto in confronto della cavia e del coniglio, mentre nella resistenza al calore queste tre speci sono invece assai somiglianti.

Infine, rivolgendo l'attenzione ai fenomeni studiati sotto la mia direzione da A. Zironi [19]), che per brevità chiameremo

fenomeni di adattamento, vediamo qui pure atteggiamenti diversi; mentre ad esempio la cavia e il cane nell'emolisi da calore si ravvicinano assai, rispetto all'adattamento appartengono invece a due categorie del tutto opposte, e inversamente la cavia e il maiale, di comportamento così diverso rispetto al calore, si dimostrano invece assai simili rispetto all'adattamento.

Queste differenze nella resistenza opposta ai varii agenti emolitici, delle quali non sarebbe difficile accrescere il numero, soprattutto se volessimo rivolgerci alle emolisine naturali dei sieri o a quelle di varii prodotti organici, alle quali per le ragioni suesposte non vogliamo invece far ricorso, ci conducono logicamente ad ammettere che sotto il nome di « *resistenza dei globuli rossi* » vengono accumulati fatti tra loro diversi, pei quali è necessaria un'analisi più minuta di quella pur non trascurabile istituita sin qui.

Dalle mie ricerche risulta intanto che per l'avvenire converrà procedere sempre con criterii comparativi, astenendosi da aprioristiche generalizzazioni di quanto si sia assodato per una determinata specie.

Ma intanto, appunto per cotale non identico modo di essere dei varii generi di emolisi, si rende possibile una diagnosi differenziale, per mezzo della sola emolisi, tra specie e specie, anche tra quelle che, rispetto a un singolo agente emolizzante, si comportano in modo eguale o non sufficientemente distinto.

Lo specchietto seguente dimostra la finezza di analisi alla quale lo studio di varii generi di emolisi ci permette di giungere:

- Resistenza all'emolisi da calore
  - piccola e media
    - non adattamento
      - piccola resist. al calore
        - emolisi in saccarosio . **cane**
        - non emol. in saccarosio **gatto**
      - media resistenza al calore . . . . . **cavallo**
    - adattamento . .
      - mediocre . . . . . **coniglio**
      - spiccatissimo . . . .
        - piccola resist. al calore **cavia**
        - media resist. al calore . **uomo**
  - forte e fortiss.ima
    - non adattamento
      - forte resistenza al calore . . . . . **bue**
      - fortissima resistenza al calore. . . . . .
        - **agnello**
        - **capretto**
    - adattamento . . . . . **maiale**

Analogamente a questo, non sarebbe arduo compilare altri specchietti, nei quali si potrebbero introdurre anche le resistenze all'emolisi da acidi, da alcali, ecc., col che la finezza di analisi per la diagnosi delle varie speci potrebbe diventare ancora maggiore.

Ma ciò sarebbe superfluo; il principio teorico che mi mosse alle ricerche, cioè la possibilità di arrivare con semplici mezzi fisico-chimici a un nuovo metodo di diagnosi specifica, senza dover ricorrere al complesso chimismo di un organismo vivo, parmi dimostrato. D'altra parte, per tutte le particolarità che riguardano le applicazioni pratiche, ho in corso altre ricerche, i primi risultati delle quali mi si presentano già come molto incoraggianti.

Riassumendo brevemente le principali conclusioni di queste ricerche, possiamo così concretarle:

I.ª — Il sangue di animali di specie diversa non si comporta in modo eguale di fronte al riscaldamento a 60°, esistendo caratteristiche differenze che permettono di distinguere le speci esaminate in varie categorie, e cioè di resistenza minima, piccola, media, forte, fortissima. Le differenze tra talune speci raggiungono gradi cospicui; così ad esempio il sangue di agnello presenta al calore una resistenza circa dodici volte maggiore di quella del gatto.

È possibile che tali differenze di resistenza al riscaldamento, riscontrabili in vitro, abbiano importanza anche nella fisiopatologia delle ustioni.

II.ª — Il calore non provoca un'emolisi improvvisa, ma produce gradatamente alterazioni tali nel globulo rosso che questo, quando non ancora abbandona l'emoglobina in seno al proprio siero o in soluzioni isotoniche, già è diventato invece incapace di trattenerla in soluzioni cloro-sodiche di titolo inferiore, ma prima del riscaldamento non emolizzanti.

III.ª — Per azione del calore la viscosità del sangue subisce, in tempo più o meno lungo a seconda delle speci, un notevole aumento, il quale però ha carattere transitorio. Talvolta si verifica poi nella viscosità un rialzo secondario.

IV.ª — Durante l'emolisi da calore il sangue subisce un certo grado di metemoglobinizzazione, non in tutte le speci della stessa intensità.

V.ª — Confrontando la resistenza all'emolisi da calore con quella agli acidi, agli alcali, a soluzioni ipotoniche di cloruro di sodio, a soluzioni isotoniche diverse, come pure con quella opposta alla emolisi putrefattiva, ovvero col modo di comportarsi dei fenomeni di adattamento, si trova che non sempre vi è tra queste varie modalità di emolisi un andamento parallelo, chè anzi si possono notare evidenti discordanze, così che ad esempio una specie con sangue pochissimo resistente agli acidi può presentarsi invece resistentissima all'emolisi da calore.

VI.ª — Da questo non identico modo di comportarsi del sangue di una data specie rispetto ad agenti emolizzanti diversi, risulta che sotto il nome di « *resistenza dei globuli rossi* » si sono accomunati fin qui dei fenomeni di ordine diverso, che meritano un' analisi più minuta di quanto non siasi fatto finora.

Per l' avvenire si dovrà altresì andar più cauti nel generalizzare quanto si sia riscontrato pel sangue di una data specie, usando con maggior larghezza di metodi comparativi.

VII.ª — Dalla varietà di comportamento di un dato sangue di fronte a varî agenti emolitici e ai fenomeni di adattamento alle soluzioni ipotoniche, risulta, come è indicato nel quadro soprariportato, che si possono differenziare l'una dall'altra anche quelle speci che rispetto a una singola modalità di emolisi non hanno peculiarità tali da poter essere distinte.

VIII.ª — Dal quadro sopraddetto, col quale si stabilisce un mezzo di diagnosi specifica basato esclusivamente su dati fisico-chimici, risulta adunque dimostrato che corrisponde alla realtà il principio teorico che mosse alle ricerche, che è cioè possibile di scoprire nuovi mezzi di diagnosi, senza esser costretti a far ricorso all'oscura produzione di anticorpi da parte del complesso chimismo di un organismo vivente.

LAVORI CITATI

[1]) Bürker. — *Gewinnung, qualitative und quantitative Bestimmung des Hämoglobins.* — Handbuch der phys. Methodik, II Bd., I Abteil., 1910.

[2]) Burkhardt. — *Ueber Art und Ursache der nach ausgedehnten Verbrennungen austretenden hämolitischen Erscheinungen.* — Arch. für klin. Chir. Band LXXV, 1904, pg. 845.

[3]) Calugareanu. — *Influence de la temperature sur la résistance des globules rouges.* — C. R. de la Soc. de Biologie, 1902, pg. 358.

[4]) W. et M. De Bichler. — *Influence du chauffage du corps sur l'hémolyse.* — Arch. intern. de Pharmacodyn. XIX, 1910, pg. 497.

[5]) Dungern und Coca. — *Ueber spezifische Hämolyse durch isotonische Salzlösungen.* — München. med. Wochenschr., 1908, pg. 14.

[6]) Ferrai. — *Ricerche viscosimetriche sul sangue in putrefazione.* — Il Policlinico, Vol. XV-M., 1908.

[7]) Gardella. — *L' emolisi da ammoniaca studiata viscosimetricamente.* — Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie, Vol. XX, 1910, fasc. I.

[8]) Hüfner. — *Neue Versuche zur Bestimmung der Sauesstoffkapazität des Blutfarbstoffs.* — Archiv. für Physiol., 1894, pg. 130.

[9]) Luzzatto. — *Influenza dei lipoidi e del siero sull' emolisi da tellurito sodico.* — Archivio di Fisiologia, Vol. VII, 1909, pg. 388.

[10]) Maragliano e Castellino. — *Sulla necrobiosi lenta dei globuli rossi.* — Archivio ital. di clinica medica, Anno XXX, 1891, pg. 381.

[11]) Mazzotto. — *Comportamento delle resistenze dei globuli rossi di mammiferi durante i processi putrefattivi.* — Bollettino della Società medico-chirurgica di Modena, Anno XIII, 1910-11, fasc. II.

[12]) Moruzzi. — *Studio fisico-chimico dell' emolisi da ipotonia.* — Archivio di Fisiologia, Vol. V, 1908, fasc. III.

[13]) Piettre et Vila. — *La spectroscopie du sang et de l' oxyhémoglobine.* — Boll. Soc. chim. de Paris, 1905, pg. 507 e Biochemisches Centralb., Band V, 1904, Nr. 11.

14) RANVIER. — Citato da BEAUREGARD et GALIPPE, *Guide pratique pour les travaux de microphotographie.* II.ª Edizione, Paris, 1888 (pg. 395).

15) ROBERT. — *Étude de l' hémolyse par les acides.* — Journ. de physiol. et de path. géner., 1906, pg. 969.

16) SCHULTZE. — *Ein heizbarer Objekttisch und seine Verwendung bei Untersuchungen des Blutes.* — Archiv. für mikroskop. Anatomie, Bd. I, 1865, pg. 31.

17) STEWART. — *The behavior of nucleated colored blood-corpuscles to certain haemolytic agents.* — Americ. Journ. of. Physiol., 1904, pg. 103.

18) VILLE e DERRIEN. — *Sur la méthémoglobine fluorée.* — Bulletin de la Soc. chimique de Paris, 1905, pg. 844 e C. R. de l' Acad. des Sciences, tome 140, 13 mars 1905.

19) ZIRONI. — *Su particolari fenomeni presentati dai globuli rossi di taluni animali in soluzioni saline ipotoniche ed ipertoniche.* Bollet. della Soc. medico-chir. di Modena, Anno XIII, 1910-11, fasc. II.